

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21720091152153

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

PSMB4蛋白在胶质瘤中表达的研究

Expression of PSMB4 Protein in Glioma

陈 建 彬

指导教师姓名: 陶 涛 教授

专 业 名 称: 细 胞 生 物 学

论文提交日期: 2012 年 05 月

论文答辩日期: 2012 年 06 月

学位授予日期: 2012 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(陶涛)课题(组)的研究成果,获得(陶涛)课题(组)经费或实验室的资助,在(陶涛)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名): 陈建彬

2012年06月06日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ☒ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：陈建彬

2012 年 06 月 06 日

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

胶质瘤是一种最常见的恶性脑肿瘤。即使采用最先进的外科手术、最优化的放射性疗法和细胞毒化学疗法方案，患者的平均存活期也只有 12 个月左右。有报道称国外研究者利用基因芯片和 siRNA 方法发现 PSMB4 蛋白可能在胶质瘤的发生发展中起着重要的作用。

本实验首次利用免疫组织化学染色技术，以胶质瘤石蜡标本为对象，初步研究 26S 蛋白酶体的 PSMB4 亚基 (Proteasome subunit beta type-4, PSMB4) 在正常脑组织与胶质瘤组织中表达的差异性，以及该蛋白的表达与患者各项临床、病理参数之间是否具有关联性。试图就 PSMB4 与胶质瘤的病理关系进行初步描述，这将为利用蛋白酶体抑制剂治疗胶质瘤的可能性提供一种新的思路。随机收集广州医院和厦门第一医院的胶质瘤例共 80 例，将所有标本制成玻片后经脱蜡、置于柠檬酸盐缓冲液中微波炉高温抗原修复后进行染色。统计 PSMB4 在各病理类型中的阳性表达率并计算染色强度。利用 SPSS 13.0 软件分析各组阳性率之间的差异是否存在统计学意义、胶质瘤组染色强度的总体分布是否存在统计学差异和试图明确该蛋白的表达与肿瘤级别、年龄、性别等参数之间是否存在关联性。结果发现在 $\alpha=0.05$ 检验水准下，在正常组与肿瘤组中各个级别胶质瘤组织之间的 PSMB4 蛋白表达阳性率差异具有统计学意义。PSMB4 蛋白表达量在肿瘤组中明显高于正常组。但在 $\alpha=0.05$ 检验水平下，各级胶质细胞瘤之间 PSMB4 蛋白表达的差异不具有统计学意义，其染色强度的总体分布也无统计学差异。PSMB4 的表达与年龄、肿瘤级别、性别之间无任何的关联，但发现年龄和肿瘤级别存在线性正相关关系。

关键词： 胶质瘤； PSMB4； 免疫组化；

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Glioma is one of the most common malignant brain tumors. Despite aggressive surgical approaches, optimized radiation therapy regimens and the application of cytotoxic chemotherapies, the median survival of patients with Glioblastoma multiform is approximately 12 months. It was reported that foreign investigators found PSMB4 protein may play an important role in glioma by gene microarray and siRNA technology.

In this experiment, we first apply immunohistochemistry technology on Paraffin wax specimens of glioma to proceed preliminary investigation on different expression of Proteasome subunit beta type-4 between normal cerebral tissues and cerebral tumors and the relevance between its expression and various clinical and pathological parameters. We try to depict preliminary pathological relation between PSMB4 protein and glioma. This will facilitate to offer a new method to cure glioma by exploring proteasome inhibitors. On random principle, all 5 normal cerebral tissues and 75 cerebral carcinoma tissues were taken as the patient research samples, which were provided from the department of pathology, the first Hospital affiliated to Xiamen University and Guangzhou General Hospital. All specimens are made into slides ,then dewaxed and on high temperature repaired antigen in microwave oven and dyed. Then we apply statistics analysis on PSMB4 protein expressing positive rate in various pathological types of glioma and calculate dye intension according to the formula . Making use of SPSS 13.0 software to do the statistical analysis, we analyse whether there is statistical significance in PSMB4 protein positive percent difference between control group and experiment group and overall distribution of glioma dyeing strength between intragroup of various grade of glioma and try to ascertain whether there is the relevance between its expression and glioma grade、age and gender .It is found that on the $\alpha = 0.05$ inspection level there is statistically significant difference in PSMB4 protein expression between normal group and glioma group. PSMB4 protein expression of glioma group is significantly higher than that of normal group. But on $\alpha = 0.05$ inspection level, PSMB4 protein expression difference of all levels of glioma is not statistically significant, so is the general distribution of dyeing strength . There is no relevance between PSMB4 expression and glioma grade、age and gender , but age and tumor level show linear relevance.

Keyword: glioblastoma; psmb4; immunohistochemistry;

厦门大学博硕士论文摘要库

目录

1 前言	1
1.1 胶质瘤	1
1.1.1 概述	1
1.1.2 星形细胞肿瘤	3
1.1.2.1 毛细胞性星形细胞瘤	3
1.1.2.2 弥漫性星形细胞瘤	3
1.1.2.3 间变性星形细胞瘤	4
1.1.2.4 胶质母细胞瘤	4
1.1.3 其它胶质瘤	5
1.1.4 治疗策略	5
1.2 泛素-蛋白酶体系统	6
1.2.1 泛素系统	6
1.2.2 蛋白酶体系统	7
1.2.2.1 CP 的结构	8
1.2.2.2 RP 的结构	8
1.2.2.3 20S 蛋白酶体其他的调节结构	8
1.2.3 与泛素-蛋白酶体途径有关的生理功能	9
1.3 PSMB4 蛋白亚基	9
1.3.1 PSMB4 蛋白的分布与分子结构特征	9
1.3.2 PSMB4 蛋白亚基的生物学功能	11
1.3.2.1 PSMB4 亚基在蛋白酶体中的作用	11
1.3.2.2 PSMB4 蛋白亚基与疾病的关系	12
1.3.3 PSMB4 蛋白与胶质瘤的关系	13
1.4 本课题研究的目的是和意义	14
2 实验材料和方法	15
2.1 实验材料	15
2.1.1. 主要材料和试剂	15
2.1.1.1 胶质瘤组织标本	15
2.1.1.2 试剂盒	18
2.1.2. 仪器设备	18
2.1.3. 常用溶液的配制	19
2.2 实验方法	20
2.2.1 组织 RNA 提取	20
2.2.2 RT-PCR 实验	21
2.2.2.1 DNase I 处理总 RNA	21
2.2.2.2 逆转录	21
2.2.2.3 PCR	22
2.2.3 免疫组化:	23
2.2.4 HE 染色	24
2.2.5 统计与分析方法	25

2.2.5.1 公式	25
2.2.5.2 判定标准	25
2.2.5.3 统计学方法	26
3 实验结果	28
3.1 PSMB4 与病理类型之间的关系	28
3.1.1 图片染色效果判定	28
3.1.1.1 检验是否存在非特异性染色	28
3.1.1.2 染色强度判定举例	28
3.2 PSMB4 在不同级别胶质瘤组织中的表达情况	28
3.2.1.各组标本阳性率比较	39
3.2.2.高级别胶质瘤与低级别胶质瘤间染色强度的比较	40
3.3 PSMB4 蛋白的表达与年龄、性别和肿瘤级别间关联性的研究	40
3.4 逆转录 PCR 分析 PSMB4 基因在各级脑胶质瘤组织中的表达	43
4 讨论	45
参考文献	47
致 谢	51

Table of contents

1 Preface	1
1.1 Glioma	1
1.1.1 Overview	1
1.1.2 Astrocytomas	3
1.1.2.1 Pilocytic astrocytoma	3
1.1.2.2 Diffuse astrocytoma	3
1.1.2.3 Anaplastic astrocytoma	4
1.1.2.4 Glioblastoma	4
1.1.3 Other glioma	5
1.1.4 Cure strategy	5
1.2 The ubiquitin-proteasome system	6
1.2.1 The ubiquitin system	6
1.2.2 The proteasome system	7
1.2.2.1 CP structure	8
1.2.2.2 RP structure	8
1.2.2.3 Other RP structure of 20S proteasome	8
1.2.3 Physical functions of the ubiquitin-proteasome system	9
1.3 PSMB4 subunit	9
1.3.1 Distribution and Molecular structure characteristics of PSMB4 subunit	9
1.3.2 Biological functions of PSMB4 subunit	11
1.3.2.1 The role of PSMB4 subunit in proteasome	11
1.3.2.2 The relationship between PSMB4 subunit and diseases	12
1.3.3 The relationship between PSMB4 subunit and glioma	13
1.4 Purpose and meaning	14
2 Materials and Methods	15
2.1 Materials	15
2.1.1 Materials and reagents	15
2.1.1.1 Specimens of glioma	15
2.1.1.2 Kit	18
2.1.2. Instrument and equipment	18
2.1.3. Solution preparation	19
2.2 Methods	20
2.2.1 Extraction of tissue RNA	20
2.2.2 RT-PCR	21
2.2.2.1 Treament of total RNA with DNase I	21
2.2.2.2 Retrotranscript	21
2.2.2.3 PCR	22
2.2.3 Imunohistochemistry:	23
2.2.4 HE Staining	24

2.2.5 Methods of statistics and analysis	25
2.2.5.1 The formula	25
2.2.5.2 The standard of judgement	25
2.2.5.3 Methods of statistics	26
3 Results	28
3.1 The relationship between PSMB4 and pathological types	28
3.1.1 Judgement of dyeing effect	28
3.1.1.1 Testing nonspecific dyeing	28
3.1.1.2 Illustration of dyeing strength	28
3.2 Expression of PSMB4 subunit in various gliomas	28
3.2.1. Comparison of positive percent of various specimens	39
3.2.2. Comparison of dyeing strength between high grade gliomas and low grade gliomas	40
3.3 The relevance between PSMB4 subunit and age, gender and glioma grade	40
3.4 PSMB4 expression in various grade glioma by RT-PCR	43
4 Discussion	45
References	47
Acknowledgements	51

1 前言

1.1 胶质瘤

1.1.1 概述

神经胶质瘤(Gliomas)亦称胶质细胞瘤,简称胶质瘤,是发生于神经外胚层的肿瘤,故亦称神经外胚层肿瘤或神经上皮肿瘤。肿瘤起源于神经间质细胞,大多数肿瘤起源于不同类型的神经胶质细胞,但由于各类神经胶质细胞组织发生学来源及生物学特征类似[1],对发生于神经外胚层的各种肿瘤,一般都称为神经胶质瘤。脑胶质瘤约占颅内肿瘤的40 %—45 % , 来源于各型胶质细胞,这是组织病理学中狭义的概念;而广义上,脑胶质瘤应包括整个神经上皮组织来源的各型胶质细胞和神经元的肿瘤。

神经胶质瘤在颅内各种肿瘤中最为常见。在神经胶质瘤中以星形细胞瘤为最常见,其次为多形性胶质母细胞瘤,室管膜瘤占第三位。性别以男性多见,特别是多形性胶质母细胞瘤、髓母细胞瘤男性明显多于女性。年龄大多见于20-50 岁间,以30-40 岁为最高峰。另外在10 岁左右儿童亦较多见,为另一个小高峰。各类型神经胶质瘤有其好发年龄,如星形细胞瘤多见于壮年,多形性胶质母细胞瘤多见于中年,室管膜瘤多见于儿童及青年,髓母细胞瘤大多发生在儿童。各类型神经胶质瘤的好发部位也不同,如星形细胞瘤多发生在成人大脑半球,在儿童则多发生在小脑;多形性胶质母细胞瘤几乎均发生于大脑半球;室管膜瘤多见于第四脑室;少突胶质细胞瘤绝大多数发生于大脑半球;髓母细胞瘤几乎均发生于小脑蚓部。

上世纪初,bailey 和Cushing (1925)以肿瘤发生的胚胎学说为基础,将胶质瘤分类为髓上皮瘤、髓母细胞瘤、胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、少突胶质瘤、室管膜瘤等;同一时期,Kernohan 与Sayra 则按肿瘤恶性程度将各种胶质瘤分成(1 - IV)四级。目前,胶质瘤的分类主要利用免疫组织化学染色的手段基于肿瘤的表型特征进行的,但有研究显示有望通过利用cDNA微阵列技术鉴别不同肿瘤的基因表达图谱在分子水平上进行分类[2-4]。2007新版的WHO 脑肿瘤分类标准(表1)就结合了免疫组织化学染色和cDNA微阵列技术这两种技术对肿瘤进行更加粗细明确的分类。

表1 世界卫生组织中枢神经系统肿瘤的分类（2007年版）
Table1 the tumor classification of central nervous system of the world health organization the in 2007

肿瘤分类	WHO分级
I Tumours of neuroepithelial tissue 神经上皮组织肿瘤	
1. Astrocytic tumours 星形细胞肿瘤	
Pilocytic astrocytoma 毛细胞型星形细胞瘤	I
Pilomyxoid astrocytoma 毛细胞黏液型星形细胞瘤	II
Subependymal giant cell astrocytoma 室管膜下巨细胞型星形细胞瘤	I
Pleomorphic xanthoastrocytoma 多形性黄色瘤型星形细胞瘤	II
Diffuse astrocytoma 弥漫性星形细胞瘤	II
Fibrillary 纤维型	II
Gemistocytic 肥胖细胞型	II
Protoplasmic 原浆型	II
Anaplastic astrocytoma 间变性星形细胞瘤	III
Glioblastoma 胶质母细胞瘤	IV
Giant cell glioblastoma 巨细胞型胶质母细胞瘤	IV
Gliosarcoma 胶质肉瘤	IV
Gliomatosis cerebri 大脑胶质瘤病	IV
2. Oligodendroglial tumours 少突胶质细胞肿瘤	
Oligodendroglioma 少突胶质细胞瘤	II
Anaplastic oligodendroglioma 间变性少突胶质细胞瘤	III
3. Oligoastrocytic tumours 少突星形细胞肿瘤	
Oligoastrocytoma 少突-星形细胞瘤	II
Anaplastic oligoastrocytoma 间变性少突-星形细胞瘤	III
4. Ependymal tumours 室管膜肿瘤	
Subependymoma 室管膜下室管膜瘤	I
Myxopapillary ependymoma 粘液乳头状型室管膜瘤	I
Ependymoma 室管膜瘤	II
Cellular 细胞型	II
Papillary 乳头状型	II
Clear cell 透明细胞型	II
Tanycytic 伸长细胞型	II
Anaplastic ependymoma 间变性室管膜瘤	III
5. Choroid plexus tumours 脉络丛肿瘤	
Choroid plexus papilloma 脉络丛乳头状瘤	I
Atypical choroid plexus papilloma 非典型性脉络丛乳头状瘤	II
Choroid plexus carcinoma 脉络丛癌	III
6. Other neuroepithelial tumours 其他神经上皮肿瘤	
Astroblastoma 星形母细胞瘤	
Chordoid glioma of the third ventricle 第三脑室的脊索瘤样胶质瘤	II
Angiocentric glioma 血管中心型胶质瘤	I

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库